

IDENTIFIKASI MELAMIN DALAM SUSU IMPOR YANG BEREDAR DI SWALAYAN BREBES DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Indah Puji Lestari, Wiranti Sri Rahayu, Pri Iswati Utami

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto,
Jl. Raya Dukuhwaluh, PO BOX 202, Purwokerto 53182,

ABSTRAK

Identifikasi melamin dalam susu impor dilakukan dengan metode KCKT. Sistem KCKT yang digunakan adalah kromatografi fase terbalik dengan fase diam kolom shimpack oktadesilina dan fase gerak asetonitril:air dengan perbandingan konsentrasi 50:50, laju alir 1,0 mL/menit, detector UV 240 nm.

Dari hasil pengujian didapatkan hubungan yang linear antara luas puncak dengan konsentrasi pada rentang 2-10 µg/mL dengan koefisien korelasi (r) 0,9988 diperoleh persamaan $Y = 0,3771 X + 0,0151$, dengan LOD = 0,5194 µg/mL dan LOQ = 1,7316 µg/mL. Uji presisi pada konsentrasi 6 µg/mL memberikan kesalahan yang relatife (KV) = 4,263%; dan ketelitian alat sebesar 99,957%. Uji perolehan kembali dengan standar 4, 6, 8 µg/mL memiliki rata-rata 98,23%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampel susu impor I, II, III dan IV yang beredar di swalayan Brebes tidak terdeteksi adanya melamin.

Kata Kunci : KCKT, Melamin, susu impor.

ABSTRACT

Identification of melamine in import milk by HPLC (High Performance Liquid) method had been done. The system of HPLC is reversed phase which stationary phase column shimpack oktadesilina and the mobile phase is acetonitrile:water (50:50), as flow rate 1.0 mL/menit, detection wavelength was 240 nm.

Indicated a linear correlation between the peak area versus concentration from 2-10 µg/mL with correlation coefficient (r) = 0.9988 and got the equation of regrestion $Y = 0.3771 X + 0.0151$, with LOD = 0.5194 µg/mL and LOQ = 1.7356 µg/mL. Precision test concentration 6 µg/mL give variation coefficient (CV) = 4.263% and the precision of instrument 99.957%. The recovery test standart 4, 6, 8 µg/mL indicated the average 98.23 %. The result presents that sample I, II, III dan IV distributed in Brebes does not contain the melamine.

Keywords : HPLC, Melamine, import milk.

PENDAHULUAN

Susu adalah cairan bergizi yang dihasilkan oleh kelenjar susu dari mamalia betina. Susu termasuk sumber

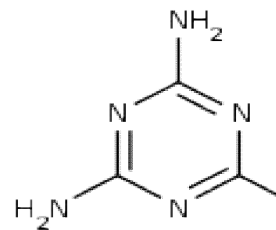
gizi utama bagi bayi sebelum mereka dapat mencerna makanan (Wikipedia, 2010). Kandungan gizi meliputi macam vitamin, lemak, karbohidrat, kolesterol dan protein. (Umiyasih

dan Anggreany, 2008).Banyak susu impor yang beredar di Indonesia dengan kualitas protein yang tinggi (BPP, 2008). Protein merupakan komponen terbesar dari tubuh setelah air.

Melamin merupakan senyawa organik yang bersifat basa dengan rumus $C_3H_6N_6$, kandungan nitrogennya sampai 66% biasanya digunakan untuk membuat plastik, lem dan pupuk. Susu yang tidak memenuhi persyaratan karena susu encer yang kadar airnya tinggi bila dibubuhkan melamin sedikit saja maka seolah-olah kadar proteinnya meningkat. Hal tersebut karena kandungan nitrogen pada struktur melamin seolah-olah akan meningkatkan kadar protein. Tahun 2008 di Beijing Cina terjadi kasus pengoplosan melamin dalam susu Sekitar 3 bayi meninggal dan lebih dari 6000 mengalami batu ginjal (Depkes RI, 2008). Jika susu yang tercemar melamin dikonsumsi, maka akan menimbulkan gangguan ginjal pada bayi dan anak. Upaya motif ini dapat meningkatkan materiil bagi produsen tanpa mempertimbangkan etika dan moral. (Yulianti, S., 2008)

Identifikasi melamin menggunakan suatu alat yaitu Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Penggunaan KCKT paling

sering untuk analisis protein, karbohidrat (Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2009:378). Penelitian ini dirancang untuk mengidentifikasi apakah susu impor yang beredar di swalayan Brebes terdapat kandungan melamin dan bagaimana validasi metode analisis melamin menggunakan metode KCKT dengan detektor Ultra Violet.



Gambar 1. Struktur Melamin ([Anonim](#), 1999)

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Melamin baku (Merek), asetonitril pro KCKT (Samarth Chemical Indonesia dengan kolaborasi teknik Scitech Laboratories USA), aquabidestilata (Otsuka), sampel susu 1, 2, 3, dan 4 (Merek), TCA 1% (1g TCA dalam 100 mL aquabidest) p.a (Merck).

Alat

Seperangkat alat KCKT Shimadzu LC-6A yang dilengkapi dengan detektor UV Shimadzu SPD-6A, pemroses data

Shimadzu SCL-6B, Kolom Shimpack Chloro Carbon Okta-desil silane (CLS-ODS) dengan panjang 15 cm dan diameter 6,0 mm, autoinjektor Shimadzu SIL-6B; neraca analitik Shimadzu AUY 220; alat-alat gelas (labu ukur, gelas ukur, pipet volume, pipet tetes, tabung reaksi); ultrasonic bath; vortex; sentrifugator; kertas saring Whatmann.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Fase Gerak

Dibuat dari campuran asetonitril - air dengan perbandingan 50:50 (v/v).

Pembuatan Larutan Baku Melamin

Melamin baku ditimbang seksama 50 mg dan dimasukkan ke dalam labu takar 500 mL, kemudian dilarutkan dengan fase gerak (asetonitril-air) sampai garis tanda, lalu disonikasikan hingga larut. Larutan tersebut mempunyai konsentrasi 100 µg/mL.

Pembuatan Kurva Baku Melamin

Dari larutan baku melamin 100 µg/mL dipipet sebanyak 1 mL, dimasukkan ke labu takar 10 mL dan ditambahkan fase gerak (asetonitril-air) sampai garis tanda, sehingga diperoleh larutan dengan

konsentrasi 10 µg/mL. Kemudian dari larutan dengan konsentrasi 10 µg/mL dipipet sebanyak 2, 4, 6, dan 8 mL, masing-masing dimasukkan ke labu takar 10 mL dan ditambahkan fase gerak (asetonitril-air) sampai garis tanda, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 µg/mL, sonikasi selama 15 menit. Pada Kolom KCKT dijenuhkan dengan fase gerak selama 20 menit. Detektor diatur pada panjang gelombang 240 nm. Kemudian larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 µg/mL disuntikkan sebanyak 200 µL ke dalam loop injektor KCKT dengan kecepatan alir fase gerak 1 mL/menit. Lalu dicatat luas puncaknya yang ditunjukkan pada kromatogram dan dibuat kurva baku serta persamaan regresinya.

Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan memasukkan 2 g serbuk susu ke dalam labu takar 50 mL, dan ditambahkan 15 mL TCA (1%), serta 5 mL asetonitril. Pada larutan tersebut di vortex selama 1 menit, di ultrasonik selama 30 menit, kocok 10 menit, dan sentrifuge selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke wadah lain dengan melewati kertas saring. Larutan

supernatan sebanyak 10 mL dimasukkan ke labu takar 25 mL dan ditambahkan fase gerak (asetonitril-air) sampai garis tanda. Larutan sampel digunakan untuk pengujian pada KCKT (Dionex, 2009).

Analisis Sampel dengan KCKT

Analisis sampel dilakukan dengan KCKT fase terbalik. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril : aquabidestilata (50:50). Kolom KCKT dijenuhkan dengan fase gerak selama 20 menit. Detektor diatur pada panjang gelombang 240 nm. Larutan sampel sebanyak 200 µl disuntikkan ke dalam loop injektor KCKT dengan kecepatan alir fase gerak 1mL/menit. Pada identifikasi (pengujian kualitatif) yang diamati adalah waktu retensi. Waktu retensi sampel dibandingkan dengan waktu retensi baku melamin.

Validasi Metode Analisis Melamin secara KCKT

Linearitas

Larutan baku yang telah dibuat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 µg/ml disuntikkan sebanyak 200 µL ke alat KCKT. Dari kurva hubungan antara konsentrasi melamin baku dengan luas area, diperoleh nilai koefisien korelasi (r)

yang menunjukkan bagus atau tidaknya linearitas.

LOD/ LOQ

Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara statistika melalui persamaan garis linear dari kurva kalibrasi.

Batas deteksi (Q)

$$Q = \frac{3S_y}{x}$$

SI

Batas kuantitasi (Q)

$$Q = \frac{10S_y}{x}$$

SI

Keterangan:

S_y/x = Simpangan baku (Sb)

SI = b pada $y = a + bx$

Presisi

Dari larutan baku melamin konsentrasi 6 µg/ mL, disuntikkan sebanyak 200 µL ke alat KCKT. Percobaan diulangi sebanyak lima kali. Luas area yang diperoleh dicatat kemudian ditentukan koefisien variasinya. Kriteria seksama diberikan jika metode secara umum memberikan KV lebih dari 5%.

Ketepatan (akurasi)

Dalam penelitian ini dilakukan akurasi dengan menggunakan metode penambahan baku (*standard addition method*). Larutan sampel dari ekstraksi sampel diambil sebanyak 200 μL (dilakukan 3 kali) kemudian ada yang tidak ditambahkan baku dan ada yang ditambahkan baku melamin dengan konsentrasi 4, 6 dan 8 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 200 μL . Kemudian larutan dikocok kuat, diultrasonik sampai homogen, didiamkan dan disaring dengan kertas saring. Dari filtrat tersebut diambil 200 μL dan disuntikkan ke alat KCKT dengan pengukuran 3 kali. Luas area yang diperoleh dicatat kemudian dihitung presentase *recovery*-nya. *Recovery* dihitung dengan membandingkan kadar melamin terukur terhadap kadar melamin teoritis.

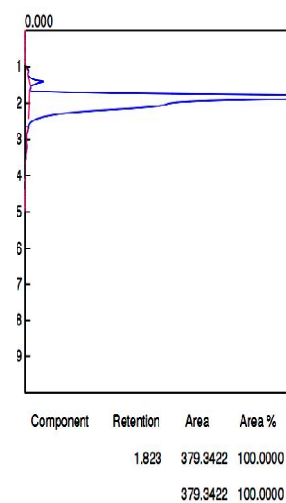
$$\text{Recovery} = (\text{kadar terukur} / \text{kadar teoritis}) \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

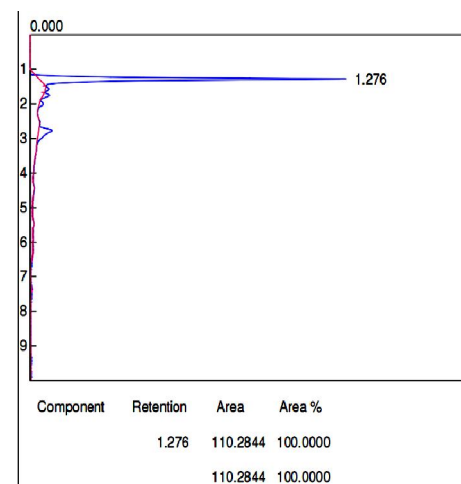
Analisis Sampel Dengan KCKT

Pada analisis sampel dengan KCKT diperoleh waktu retensi melamin standar 1,823 menit. Pada keempat sampel susu impor tidak menghasilkan

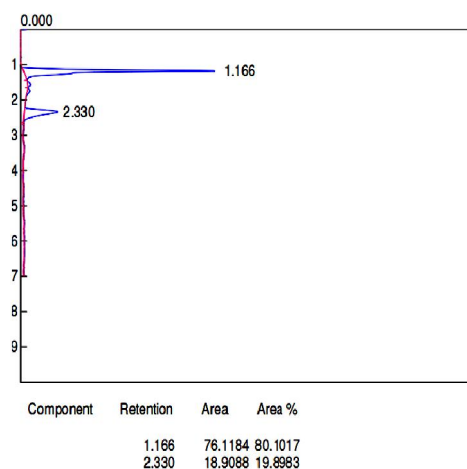
puncak kromatogram pada waktu retensi standar tersebut. Waktu retensi sampel 1, 2, 3, dan 4 masing-masing adalah 1,276; 1,166; 1,626; dan 1,626 menit. Hal ini menunjukkan bahwa pada semua sampel yang diteliti tidak terdeteksi adanya melamin.



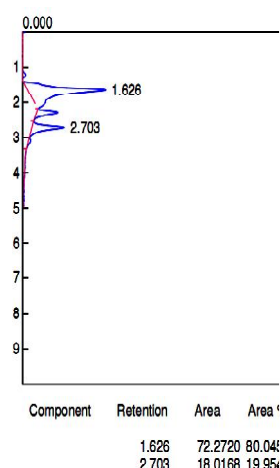
Gambar 1. Kromatogram melamin standar



Gambar 2. Kromatogram analisis melamin pada sampel susu 1.



Gambar 3. Kromatogram analisis melamin pada sampel susu 2.

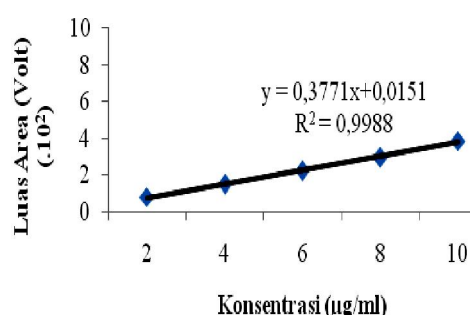


Gambar 4. Kromatogram analisis melamin pada sampel susu 3 dan susu 4.

Hasil Uji Linieritas

Persamaan kurva baku yang diperoleh $y = 0,377172x + 0,0151$ dengan nilai koefisien korelasi atau $r = 0,9988$. Nilai r mendekati $+1$, yang menunjukkan adanya hubungan yang linier antara konsentrasi dengan luas area yang

dihasilkan. Harga r diterima, karena $r_{\text{tabel}} < r_{\text{hitung}}$, yaitu $0,878 < 0,9988$ dengan derajat bebas (db) sebesar 3, nilai α sebesar 5% dan taraf kepercayaan 95%. Hal ini menunjukkan bahwa kurva kalibrasi melamin memberikan linieritas yang baik.



Gambar 1. Kurva Kalibrasi Melamin baku (konsentrasi vs luas area)

Tabel 1. Hasil Uji Linearitas Larutan Baku Melamin

No.	Konsentrasi (µg/ml)	Waktu Retensi (menit)	Luas Area (Volt) (.10 ²)
1.	2	1,816	0,8126
2.	4	1,803	1,5192
3.	6	1,803	2,2283
4.	8	1,796	2,9732
5.	10	1,783	3,8573

Hasil Uji LOD & LOQ

Penentuan limit deteksi yang diperoleh 0,5194 µg/ml dan limit kuantitasi sebesar 1,7316 µg/ml Hal ini berarti batas kadar terendah yang masih menunjukkan respon jika dibandingkan dengan *base line noise* pada analisis melamin dengan metode KCKT adalah

sebesar 0,5194 µg/ml, sedangkan konsentrasi terkecil melamin yang masih bisa diukur secara valid menggunakan metode KCKT adalah sebesar 1,7316 µg/ml.

Hasil Uji Ketelitian (Presisi)

Hasil presisi konsentrasi 6 µg/ml diperoleh nilai KV= 4,263% yang berarti tidak melebihi 5 %, sehingga dapat dikatakan bahwa metode pada identifikasi melamin dalam susu impor dengan KCKT memenuhi persyaratan ketelitian. Kriteria ketelitian diberikan jika metode memberikan koefisien variasi 5%. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, kerumitan sampel, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium sehingga KV 5 - 10% masih dapat diterima (Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2009:384).

Hasil Uji Ketepatan (Accuracy)

Dari hasil uji akurasi diperoleh %*recovery* rata-rata pada konsentrasi 4 µg/ml adalah 103,60%, *recovery* rata-rata pada konsentrasi 6 µg/ml adalah 65,81% dan *recovery* rata-rata pada konsentrasi 8 µg/ml adalah 125,28%. Pada konsentrasi 6 dan 8 µg/ml menghasilkan persen *recovery* kurang dari 80% yang berarti

tidak memenuhi persyaratan *recovery*. Namun, konsentrasi 4 dan 8 µg/ml dapat mewakili dari konsentrasi rendah dan tinggi untuk uji *recovery*, sehingga menunjukkan bahwa metode yang digunakan pada identifikasi melamin dalam susu impor memenuhi persyaratan uji *recovery* yaitu 80%-120% (Harmita, 2004: 118). Kesalahan sistematika bersifat ajeg (konstan) dan berhubungan dengan ketelitian (akurasi) hasil analisis. Kesalahan jenis ini mengakibatkan penyimpangan tertentu dari rata-rata (mean).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tidak terdeteksi adanya melamin dalam sampel susu impor I, II, III dan IV yang diambil dari beberapa produk susu impor yang beredar di Swalayan brebes.
2. Metode analisis yang digunakan mempunyai nilai linearitas, ketelitian, LOD, LOQ dan ketepatan yang memenuhi persyaratan parameter validasi metode analisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonym, 1999. *Melamine*. <http://www.inchem.org/sids/sids/108781/pdf>, diakses tanggal 20 September 2009.
- Anonym, 2001. *Petunjuk operasional penetapan cara pembuatan obat yang baik Edisi 2001*. Jakarta: badan POM.
- Badan Penelitian dan pengembangan pertanian, 2008. *Mutu Kedelai Nasional Lebih Baik dari Mutu Kedelai impor*, www.litbang.deptan.go.id/.../Mutu%20Kedelai%20Nasional%20Lebih%20Baik%20dari%20Kedelaipdf, diakses tanggal 20 April 2010.
- Badan POM, RI, 2008. *Melamin Dalam Produk pangan*, <http://www.perpustakaan.pom.go.id/KoleksiLainnya/InfoPOM/0608.pdf>, diakses tanggal 9 Desember 2009.
- Depkes. RI, 2008. *MEDIAKOM Info Kesehatan untuk Semua*, perpustakaan.depkes.go.id:8180/bitstream/.../2/MEDIAKOM141008.pdf, diakses tanggal 10 Desember 2009.
- Dionex, 2009. *Determination of Melamine in Milk Powder by Reversed-Phase HPLC with UV Detection*, <http://www.dionex.com/en-us/webdoes/70949-AN224-HPLC-Melamine-Milkpowd-18Mar09-LPN2184.pdf>, diakses tanggal 16 Desember 2009.
- Gandjar, I. G. & Rohman, A. 2009. *Kimia Farmasi Analisis*, Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Harmita, 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode & Cara Perhitungannya* dalam Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. 1 No. 3.
- Umiyasih, U & Anggraeny Y. N, 2008. *Intensifikasi Pengembangan Teknologi Pengolahan Susu Skala Rumah Tangga Petani Untuk Mendukung Peningkatan Konsumsi Susu dan Hasil Olaha*
- Wikipedia, 2010. *Susu*, <http://en.wikipedia.org/wiki/melamin>, diakses tanggal 10 April 2010.
- Yuliati, S. 2008. *Mengapa Melamin Ada Dalam Susu Bubuk*, www.ditjennak.go.id/publikasi/%5Cmengapa.pdf, diakses tanggal 25 Desember 2009.

